

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 juillet 2004 (22.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/060407 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 48/00, C12N 15/87, A61L 27/12, C04B 28/34,
40/00, 41/50, A61L 27/32, A61K 9/00, 9/16

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003897

(22) Date de dépôt international :
24 décembre 2003 (24.12.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/16785 27 décembre 2002 (27.12.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
URODELIA [FR/FR]; Lieudit Le Gaillard Route de Saint
Thomas, F-31470 Saiguede (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : ROU-
QUET, Nicole, Francine [FR/FR]; 15, rue Auguste
Comte, F-31400 Toulouse (FR). FRAYSSINET, Patrick,
Pierre [FR/FR]; Lieu dit Le Gaillard, Route de Saint
Thomas, F-31470 Saiguede (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: CALCIUM PHOSPHATE CERAMICS AND PARTICLES FOR IN VIVO AND IN VITRO TRANSFECTION

(54) Titre : PARTICULES ET CERAMIQUES DE PHOSPHATES DE CALCIUM POUR LA TRANSFECTION *IN VIVO* ET *IN VITRO*

(57) Abstract: The invention relates to a method of modifying the surface of calcium phosphate ceramics and powders. The in-
ventive method involves maturation in a culture medium, thereby causing epitaxial carbonated apatite growth at the surface of the
aforementioned ceramics and powders. The invention also relates to the use of said modified ceramics and powders for *in vitro* and
in vivo cell transfection and for cell culture in a three-dimensional network.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à un procédé pour modifier la surface des poudres et des céramiques de phosphates
de calcium comprenant une maturation dans un milieu de culture entraînant une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à la sur-
face desdites poudres et céramiques. L'invention porte également sur l'utilisation desdites poudres et céramiques modifiées pour la
transfection de cellules *in vitro* et *in vivo* et pour la culture en réseau tridimensionnel.

WO 2004/060407 A1

Particules et céramiques de phosphates de calcium**pour la transfection *in vivo* et *in vitro***

- 5 La présente invention se rapporte à une méthode de transfection d'ADN fixé à surface de céramiques phosphates de calcium de caractéristiques particulières. Cette méthode peut comporter une étape de préparation du matériau dans une solution saline ou un milieu de culture cellulaire pour améliorer la fixation d'ADN et sa disponibilité pour la transfection de cellules. L'invention porte également sur l'utilisation des poudres et
- 10 céramiques de phosphates de calcium modifiées pour la transfection de cellules *in vitro* et *in vivo* et pour la culture de cellules transfectées en réseau tridimensionnel.

- La transfection de gènes dans les cellules eucaryotes est une étape clef de la thérapie génique. Plusieurs méthodes sont utilisables avec des rendements variables. Elles sont
- 15 utilisables *in vitro* ou *in vivo*.

- A des fins de thérapie géniques, les cellules peuvent être transfectées *in vitro* puis réinjectées dans l'organisme ou bien transfectées directement dans les organes ou les tissus dans lesquels elles résident (Evans, C.H., Robbins, P.D., Possible orthopaedic
- 20 applications of gene therapy, J Bone Joint Surg, 77-A, 7 : 1103-1114)

Les différentes méthodes utilisées pour la transfection cellulaire sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Méthode	Avantages	Inconvénients
DEAE-dextran	Simple	Expression transitoire
Phosphate de calcium	Simple	Inutilisable pour cellules en suspension
Liposomes	Simple	Relativement non prouvé
Micro-injection	Efficace	Techniquement difficile
Electroporation	Bon pour les cellules non	Pas de co-transfection

	adhérentes	
Fusion de protoplastes	Bon pour les cellules non adhérentes	Résultats variables
Adénovirus	Forte infectivité, production in connue, infecte les cellules ne se divisant pas, grande variété de cellules hôtes	ADN intégrés comme épisode, toxique, production de protéines virales
Adénovirus associés	Non pathogènes, Expression stable, infecte les cellules ne se divisant pas, grande variété de cellules hôtes	Supporte seulement des gènes courts, difficile à produire, peu développé
Herpès simplex	Infecte les cellules ne se divisant pas, supporte des gènes longs, Efficace	Toxique, expression transitoire, peu développé
Infection par retrovirus		Type cellulaire réduit par le tropisme, capacité de codage basse,
Solides polycationiques	Simple, transfection localisée	Expression transitoire
Chromosome satellite	Permet de transfecter des gènes longs	Résultats non prouvés
Autres : polymers sous forme d'hydrogel, lipids polycationiques, polylysine, polyornithine, histones et autres proteins chromosomiques, polymères hydrogenés		Faibles rendements, résultats variables, utilisations in vivo difficile, biocompatibilité variable

Depuis une quinzaine d'années qu'ont débuté les essais cliniques de thérapie génique, les résultats ont été dans l'ensemble décevants pour plusieurs raisons :

- Quels que soient les vecteurs utilisés, adénovirus, virus associé à l'adénovirus (AAV), rétrovirus ou formulation physico-chimiques, l'efficacité de transfert des gènes dans les cellules cibles a toujours été très faible (A. Kahn. Dix ans de thérapie génique: déceptions et espoirs. *Biofutur* 202:16-21, 2000). La durée d'expression des transgènes thérapeutiques est la plupart du temps brève, limitée à quelques semaines, en raison

d'une réaction immune qui provoque l'élimination préférentielle des cellules transduites, de la longévité intrinsèque de celles-ci ou de l'extinction des séquences d'ADN ou promoteurs qui dirigent l'expression des gènes insérés (Orkin, S.H., Motulsky, A.G., report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research gene therapy. www.nih.gov/news/panelrep.html).

Enfin certains vecteurs ont manifesté un effet toxique. Des accidents sont survenus lors d'utilisation de vecteurs adénoviraux injectés dans l'organisme ayant entraîné la mort de patients dans des essais de traitement par l'ornithine transcarbamylase (Smaglik, P., Investigators ponders what went wrong after gene therapy death. *The Scientist* 13 [21]: 1 (1999).

Ainsi, il ressort de l'analyse de tous les essais cliniques de thérapie génique que la stratégie de transfert d'un gène nécessiterait des vecteurs beaucoup plus performant, plus sûrs et capables de transfecter préférentiellement les cellules sur lesquelles un effet thérapeutique est nécessaire (Orkin, S.H., Motulsky, A.G., report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research gene therapy. www.nih.gov/news/panelrep.html).

C'est pour cette raison que des vecteurs polymériques polycationiques ont été développés. Ces vecteurs sont des solides et peuvent adsorber de l'ADN sous différentes formes, en particulier, sous forme de plasmide. Ils ont la particularité de transfecter les cellules qui arrivent à leur contact avec un rendement variable. Ils ont été utilisés *in vivo* pour transfecter des cellules des tissus conjonctifs lâches intervenant dans la cicatrisation osseuse afin d'accélérer cette dernière (S. Goldstein and J. Bonadio. *in vivo* gene transfer methods for wound healing. *The Regent of the University of Michigan*. Anonymous. United States:(5,962,427):1-31, 1999. thérapie génique. A61K 48/00. 514/44).

- Les coprécipités de phosphates de calcium et d'ADN ont été utilisés depuis de nombreuses années afin de transfecter les cellules *in vitro* (E. T. Schenborn and V. Goiffon. Calcium phosphate transfection of mammalian cultured cells. edited by M. J. Tymms, Totowa, NJ:Humana Press Inc, 2000, p. 135-144; W. Song and D. K. Lahiri.
- 5 Efficient transfection of DNA by mixing cells in suspension with calcium phosphate. *Nucleic Acid Research* 23 (17):3609-3611, 1995; Y.-W. Yang and J.-C. Yang. Calcium phosphate as a gene carrier: electron microscopy. *Biomaterials* 18:213-217, 1997).
- 10 Ils sont obtenus en versant une solution de chlorure de calcium dans le milieu afin de le sursaturer en calcium et de précipiter un phosphate de calcium dans lequel sont incluses des molécules d'ADN. Ces particules composites sont ensuite phagocytées par les cellules qui intègrent le plasmide de différentes manières et expriment les gènes qui sont transportés.
- 15 Cependant, ces coprécipités ont un inconvénient majeur. Ils sont très difficilement utilisables *in vivo* car il est difficile d'obtenir une sursaturation en système ouvert. D'autre part, ils ne peuvent permettre des transfections localisées dans l'espace.
- 20 Les céramiques de phosphates de calcium sont des matériaux obtenus par frittage d'une barbotine contenant des particules de phosphate de calcium en suspension. Ce sont des assemblages de grains liés par des joints de grains (Frayssinet,P., Fages, J., Bonel,G., Rouquet,N., Biotechnology, material sciences and bone repair. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology* (1998) 8: 17-25).
- 25 Ces matériaux présentent une biocompatibilité particulière avec le tissu osseux, ce qui les rend particulièrement utiles comme matériau de reconstruction osseuse ou bien comme vecteur de cellules ostéogéniques (P., Frayssinet, J.L. Trouillet, N. Rouquet, E. Azimus, A. Autefage (1993), Osseointegration of macroporous calcium phosphate
- 30 ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials*, 14, 6: 423-429).

Dans le cadre de l'invention, nous avons développé des poudres et des céramiques de phosphate de calcium capables de transférer des cellules à la fois *in vivo* et *in vitro*, notamment des cellules mésenchymateuses. La composition chimique de ces céramiques peut varier car plusieurs sels de l'acide orthophosphorique peuvent rentrer dans leur composition, en particulier, le phosphate tricalcique, l'hydroxyapatite qui est la phase de synthèse la plus proche de la phase minérale du tissu osseux, et le phosphate octocalcique. Ces céramiques ont une autre particularité, elles ont des propriétés de surface très variables en fonction de différents paramètres tels que, parmi d'autres, le mode de synthèse de la poudre, la température de cuisson, ou la présence de divers éléments traces. Ces différents facteurs influent en particulier sur la charge de surface, le potentiel zeta et les capacités de substitution dans la maille du phosphate de calcium. Les céramiques phosphocalcique ont également la particularité de présenter des croissances épitaxiales d'apatite carbonatée à leur surface une fois implantées dans l'organisme ou immergées dans un milieu salin de composition comparable au liquide extracellulaire (M. Heughebaert, R. Z. LeGeros, M. Gineste, and A. Guilhem. Hydroxyapatite (HA) ceramics implanted in non-bone-forming sites. Physico-chemical characterization. *J Biomed Mat Res* 22:257-268, 1988). C'est à ces croissances cristallines qu'ont été attribuées les propriétés de biocompatibilité de ces matériaux.

Les propriétés d'adsorption des phosphates de calcium vis-à-vis des acides nucléiques ont été mises à profit en chromatographie sur colonnes d'HA pour séparer et purifier l'ADN ou certains ARN. Il est essentiel de comprendre que, à composition chimique égale, toutes les poudres d'hydroxyapatite utilisées en chromatographie n'ont pas le même pouvoir séparateur des acides nucléiques (A. Eon-Duval, Purification of plasmid DNA by hydroxyapatite chromatography, Abstract of 2nd conference on hydroxyapatite. San Francisco March 2001). Les interactions entre les molécules organiques et l'hydroxyapatite dépendent des propriétés de surface de ce minéral (M.J. Gorbunoff, Protein chromatography on hydroxyapatite columns. *Methods in*

Enzymology, vol 182, Academic Press Inc 1985 : 329-339), qui peuvent varier d'un lot à l'autre.

Il a été prouvé que la distribution des charges à la surface du solide et ses capacités
5 d'hydratation ont une influence importante sur l'adsorption des molécules organiques à sa surface (Norde, W., Lyklema, J., (1991) Why proteins prefer interfaces. J Biomed Sci Polymer Edn 2, 183-202 (1991)). De même, la force ionique, et le pH du solvant des molécules organiques doivent être pris en compte.

10 Si la protéine en solution et le solide ont une charge opposée, ils s'attirent. Au moins si la charge de la protéine et celle de la surface du solide se compensent grossièrement. Si les charges ne se compensent pas, cela résulte en une accumulation de charges dans la région de contact causant un haut potentiel électrostatique, énergétiquement peu favorable à une adsorption. Une situation similaire est observée lorsque la surface du
15 solide et la molécule organique sont de même signe. Néanmoins, dans de nombreux cas, l'adsorption peut se faire tout de même dans certains cas grâce à l'incorporation d'ions de la solution à l'interface de la couche adsorbée qui prévient l'accumulation de charge.

20 L'hydrophobie a une influence sur l'adsorption car elle participe à la répartition des charges en particulier dans les molécules organiques qui ont une structure tertiaire et quaternaire. L'hydrophobie d'une surface (molécule ou bien solide) peut favoriser l'adsorption.

25 La répartition des charges ainsi que les capacités d'hydratation des apatites sont des propriétés intéressantes car elles peuvent avoir une charge de surface positive ou négative et peuvent être hydrophiles ou hydrophobes. De plus, les substitutions dans la maille pouvant être nombreuses, les groupes fonctionnels à la surface peuvent varier.

- Nous avons développé des poudres de phosphates de calcium à base d'hydroxyapatite capables de fixer de l'ADN sous différentes formes et de le délivrer à des cellules isolées ou dans l'organisme à des fins de transfection. Ces poudres peuvent être injectés en suspension dans un liquide ou bien un gel. Elles peuvent également être
- 5 déposées à la curette ou bien servir de vecteur transfectant à des cellules cultivées en réseau tridimensionnel. Elles ont des propriétés physico-chimiques particulières afin de posséder ces propriétés de transfection. Une série d'expérimentation a été menée permettant de juger la transfection de cellules isolées ou non avec un plasmide porteur du gène de la galactosidase pouvant être mis en évidence par histochimie. La poudre
- 10 est une mise en forme particulièrement bien adaptée pour pouvoir transfecter à la fois des cellules isolées ou des tissus à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces poudres permettent une internalisation de l'ADN ainsi que sa protection des nucléases intracytoplasmiques et son transfert dans le noyau.
- 15 Le mécanisme intervenant dans la fixation d'ADN (molécule organique de charge négative) à la surface de particules d'hydroxyapatite peut-être :
- Une adsorption électrostatique lorsque le matériau est de charge positive
 - Une coprécipitation des molécules d'ADN dans la couche d'apatite carbonatée apparaissant par croissance épitaxiale à la surface de ces
- 20 matériau et résultant de processus de dissolution/reprécipitation complexes se déroulant à la surface dans des milieux sursaturés en calcium et phosphore.
- Un échange ionique entre la phase interfaciale et la solution
- 25 L'ADN une fois fixé sur le matériau doit pénétrer dans la cellule. La composition et les caractéristiques de surface sont également importants pour la dégradation du matériau en milieu biologique et l'émission de particules transfectantes. On sait que les céramiques d'HA se dégradent aux joints de grains et que la couche d'apatite

carbonatée apparaissant à la surface du matériau par croissance épitaxique a une solubilité différente du matériau lui-même.

En revanche, tous les phosphates de calcium ne peuvent transfecter des cellules. Le
5 DCPD par exemple ou bien certaines mises en forme d'HA ou de TCP ont montré leur incapacité à le faire. Leur cytotoxicité est certainement responsable de ceci.

Au contraire, la modification de la surface des poudres et des céramiques par maturation dans un milieu de culture entraînant une croissance épitaxique d'apatite
10 carbonatée améliore le rendement de marquage.

Description

Ainsi, dans un premier aspect, la présente invention se rapporte à un procédé pour créer
15 un composite minéral-ADN caractérisé en ce qu'il comprend une étape consistant en une incubation dans un milieu salin ou de culture non saturé en calcium et phosphore en présence de la molécule d'ADN. Ce procédé permet d'obtenir une fixation d'ADN à la surface de la céramique par adsorption sur une surface de céramique modifiée par croissance épitaxique ou bien par co-précipitation à la surface du matériau. Ces
20 particules de phosphates de calcium sont immergées dans un milieu salin ou un milieu de culture du type des milieux de culture cellulaire couramment employées en biotechnologie, notamment le DMEM, pendant environ quelques minutes, par exemple 1, 5, 10 ou 30 minutes au moins à environ 12, 24, 48 heures, quelques jours ou davantage à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C. Le but
25 est d'avoir la formation d'une couche d'apatite carbonatée à la surface avant ou pendant la mise en contact avec les plasmides.

Dans un mode de réalisation particulier, le procédé mentionné ci-dessus est réalisé avant la mise en contact avec les acides nucléiques, notamment des plasmides. Alternativement, cette étape entraînant une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à

la surface desdites poudres et céramiques est réalisée dans un milieu contenant les acides nucléiques. Dans ce mode, la modification de surface et la fixation des acides nucléiques sont réalisées simultanément.

De préférence, les poudres et céramiques sont immergées dans un milieu de culture DMEM pendant 48 heures à 37°C avant ou simultanément à la fixation des acides nucléiques.

Dans un aspect complémentaire, l'invention porte sur un procédé pour fixer de l'ADN sous forme plasmidique à la surface de poudre ou céramique de phosphates de calcium caractérisé en ce qu'il comprend une étape a) consistant en une hydratation de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium dans une solution de tampon phosphate non saturée en calcium et phosphate et une étape b) consistant en une immersion des produits obtenus à l'étape a) dans une solution de tampon phosphate non saturée en calcium et phosphate contenant un ADN simple ou double brin pour des durées variables de quelques minutes à plusieurs heures, c) obtention de particules de phosphates de calcium comportant des molécules d'ADN fixées à sa surface.

De préférence, la solution de l'étape a) et b) comprend un tampon phosphate à 0,12 M (pH 6,8). L'immersion est effectuée pendant au moins 1, 5, 10 ou 30 minutes jusqu'à environ 12, 24, ou 48 heures à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C. En outre, les particules de phosphates de calcium sont maintenues immergées dans un milieu de culture du type des milieux de culture cellulaire, pendant environ quelques minutes à quelques jours, et à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C.

Ainsi, dans ce procédé, l'hydratation réside de préférence en une immersion de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique de phosphate de calcium dans une solution simulant les fluides extracellulaires destinée à produire une croissance

épitaxique d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques. A ce titre, l'étape b) est réalisée au moyen d'un milieu simulant les fluides extracellulaires ou un milieu du type des milieux de culture cellulaires contenant les acides nucléiques, ledit milieu étant non dénaturant pour l'ADN et non saturé en calcium et phosphate. Ce milieu entraîne une croissance épitaxique d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques.

Les étapes a) et b) peuvent être effectuées simultanément ou successivement. Ainsi, on peut mettre en œuvre l'invention avec une solution contenant un ADN simple ou double brin pour des durées variables de quelques minutes à plusieurs heures à environ 37°C.

Avantageusement, ce procédé permet de fixer l'ADN à pH physiologique sur des particules de phosphate de calcium dans des conditions qui ne sont pas dénaturantes pour la molécule d'ADN. Les céramiques peuvent être des céramiques poreuses ou denses.

Dans un autre aspect, l'invention porte sur un procédé pour transférer des cellules isolées, cultivées en monocouche ou en trois dimensions consistant en la mise en contact des cellules à transférer avec les particules obtenues par le procédé décrit ci-dessus pendant des durées de quelques heures à quelques semaines. Ce procédé peut également être mise en œuvre pour transférer des cellules contenues dans un fragment tissulaire cultivé. Les particules obtenues mentionné ci-dessus est particulièrement utile pour la préparation d'un médicament pour transférer in vivo des cellules contenues dans un tissu ou dans un organe.

Dans un autre aspect, l'invention porte sur les poudres et les céramiques de phosphates de calcium susceptibles d'être obtenues à partir du procédé décrit ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles peuvent supporter une croissance épitaxique d'apatite

carbonatée à leur surface dans des conditions non dénaturantes, notamment dans une solution saline non saturée et non dénaturante pour les macromolécules biologiques.

L'invention vise également ces poudres et céramiques de phosphates de calcium comprenant en outre les acides nucléiques fixés à leur surface.

5

Ces produits sont particulièrement efficaces pour la transfection de cellules *in vitro* et *in vivo*.

Avantageusement, les poudres et céramiques obtenues possèdent au moins l'une des propriétés décrites ci-après avant la modification de surface :

10

- Nature des groupes chargés à la surface : PO_4^- , OH^- , Ca^{++}

- pH de surface basique

- Potentiel électrocinétique négatif

- Hydrophobe

15

- granulométrie comprise entre 0-200 μm , en particulier entre 80-125 μm et 0-25 μm .

De préférence, les produits de l'invention comprennent l'ensemble des caractéristiques décrites ci-dessus.

20 En outre, les poudres et céramiques de phosphates de calcium mentionnées ci-dessus peuvent comporter un noyau composé d'un autre matériau polymérique, céramique ou métallique, de préférence magnétique.

25 L'invention vise également les particules formées à base de poudres de phosphates de calcium décrites ci-dessus, lesdites particules étant comprises dans une matrice minérale ou polymérique, en particulier dans des ciments de phosphate ou de sulfate de calcium.

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à un revêtement de céramiques de prothèses articulaires ayant les caractéristiques de la céramique définie ci-dessus.

L'invention vise également l'utilisation desdites poudres et céramiques de phosphate de calcium chargée en ADN à leur surface comme support pour la culture cellulaire, notamment pour la culture en réseau tridimensionnel de cellules transfectées par le support et pour la transfection de cellules *in vitro* et *in vivo*.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif. Ils constituent des modes de réalisations préférés de l'invention.

Exemple 1 : Caractéristique des poudres utilisées

Type P15: poudre sphérique de surface spécifique 0,62 m²/g. Elles ont été calcinées à 1180°C et leur granulométrie est comprise entre 80-125 µm.

Type P1: poudre de forme quelconque de surface spécifique 56,84 m²/g, non calcinée (brute) de granulométrie comprise entre 0-25 µm.

L'étude granulométrique des poudres utilisées montre que les poudres sphériques (P15) ont une tranche granulométrique bien définie alors que celles de forme quelconque (P1) a des tranches granulométriques beaucoup plus larges avec beaucoup de particules fines. Le pH de charge nulle varie avec la température de calcination des poudres. Le potentiel zéta de la poudre P1 mesuré dans de l'eau déminéralisée est de -27,5 mV et le pH de surface est de 9,08.

En fonction de la température de frittage de la poudre, le pH de charge nul est variable mais largement inférieur au pH physiologique. Ceci signifie que quelque soit la

température de frittage, le potentiel électrocinétique des poudres, au pH neutre, est négatif.

- 5 L'examen en microscopie à balayage des poudres sphériques montre qu'elles sont constituées par des grains assemblés par des joints de grains. Il existe des irrégularités de surface sur certaines des faces des grains à fort grossissement.

Poudre	P1	P15
Nature des groupe chargés	PO_4^- , OH^- , Ca^{++}	PO_4^- , OH^- , Ca^{++}
Potentiel électrocinétique (mV)	-27,5	-35
Hydrophobicité	+	+
PH de surface	9,8	7,8
Granulométrie (μm)	0-25	80-125
Surface spécifique (m^2/gr)	56,84	0,62
pH de charge nul		
Forme des poudre	anguleuse	sphérique

10 **Exemple 2 : Méthode de fixation de l'ADN sur le vecteur**

Le vecteur peut être utilisé de deux manières différentes :

- Méthode A :** Il peut être incubé directement avec le plasmide dans une solution de tampon phosphate. Il est alors maintenu incubé dans celui-ci pendant plusieurs heures
 15 alors que sa surface est modifiée par croissance épitaxiale d'apatite carbonatée. La fixation peut alors se faire par coprécipitation à la surface du matériau.

- Méthode B :** Il peut également être mis en présence d'une solution saline pendant plusieurs jours afin de modifier la surface. Une fois que celle-ci est équilibrée, le matériau est ensuite mis dans la solution contenant le plasmide. La fixation de l'ADN
 20 est supposée se faire alors à la surface de la du matériau modifié.

Fixation du plasmide sur la surface des particules natives (méthode A):

L'ADN double brin a une affinité marquée pour l'HA lorsqu'il est dissous dans de faibles concentrations de tampon phosphate. Ils sont élués dans des concentrations
5 supérieures de tampon phosphate. 1 m² de surface de poudre a été disposé dans les boîtes de Pétri soit 1,61 gr pour le type A et 0,017 g dans le type B.

- Hydratation de la poudre d'HA (2ml/g) dans 10ml de tampon phosphate 0,12M à pH 6,8. Chauffage 15 à 30 mn à 100°C.
- 10 • Laisser reposer à température ambiante et sortir le tampon. Re-suspendre dans 5 à 10 ml de 0,12 M de tampon phosphate à pH 6,8 à 60°C, décanter et resuspendre dans 5 ml du même tampon à 60°C.
- Ajouter l'échantillon de l'acide nucléique dans 1 ml de tampon phosphate 0,12M à pH 6,8 à 40°C (l'élution des acides nucléiques doubles brins
15 peut se faire en lavant l'HA 8 à 10 fois avec 0,5 ml de tampon phosphate (0,4M)).

Fixation du plasmide à la surface des particules modifiées par croissance épitaxiales (méthode B):

- Les particules ont été incubées à 37°C dans du milieu de culture DMEM
20 pendant 48 heures.
- Elles sont lavées dans une solution de tampon phosphate 0,12M à pH 6,8
- On ajoute l'échantillon de l'acide nucléique dans 1 ml de tampon phosphate 0,12M à pH 6,8 à 40°C

25

Exemple 3 : Transfection de cellules *in vitro*

Trois lignées ont été utilisées:

- Cartilage de croissance de lapin

- Périoste de lapin
- Cellules de calvaria de rat

Elles sont obtenues en digérant la matrice collagénique dans une solution de collagénase suivie d'une centrifugation.

5

3.1 Matériau à surface non modifiée

La quantité de poudre (type B) a toujours été la même : 10 mg.

Lors de la transfection les cellules n'étaient pas à confluence. Les cellules ont été transfectées à J0 et la première évaluation par histochimie de l'expression de la galactosidase a été faite à J4, J21, J30.

10

A J4:

Toutes les lignées présentent des zones de marquage. Dans les puits transfectés avec des particules, les cellules marquées sont groupées autour des particules bien que certaines en soient néanmoins éloignées. Cet éloignement peut s'expliquer par le fait que les particules émettent des débris avec une surface spécifique élevée. On les voit au microscope au milieu de groupes de cellules marquées. Cellules de cartilage de croissance: en valeur absolue, c'est la série qui a été le plus marquée.

15

A J21

En ce qui concerne les cellules de cartilage, le nombre de cellules transfectées est important. Les cellules des calvarias de rats sont fortement positives.

20

A J30

Les cellules ont une inhibition de contact relative, elles sont quasiment en trois dimensions et arrondies. La plupart des cellules des trois groupes sont positives. Le nombre de cellules positives et le taux de croissance précédent semblent indiquer que les plasmides sont transmis d'une cellule à l'autre ou bien que le relargage de particules d'ADN s'étale dans le temps, le pourcentage de cellules positives aurait été très faible dans le cas contraire. Il est également possible que les relargages de particules transfectantes soient progressifs. Les cellules marquées préférentiellement sont celles au contact des particules.

25

Pourcentage des cellules marquées en fonction des lignées utilisées :

Temps (jours)	calvaria	Cartilage de conjugaison	périoste
4	15	32	27
21	39	42	35
30	65	71	60

5 3.2 Matériau à surface modifiée par croissance épitaxique

Dès les premiers temps de la culture, la plupart des cellules sont marquées.

3.2.1 Transfection de part et d'autre d'une membrane hémiperméable

Les grains ont été disposés au contact des cellules soit séparés de celles-ci par une
 10 membrane poreuse (0,2µm) en polycarbonate les séparant du tapis cellulaire. Le marquage cellulaire par la galactosidase est évalué par histochimie à J4.

Les cellules en contact direct avec les particules sont marquées sporadiquement. Les cellules qui ne sont pas au contact des particules (séparées par la membrane) sont également marquées. Il existe donc des particules transfectantes de taille inférieure à
 15 0,2 µm passant à travers les pores de la membrane en polycarbonate.

3.2.2 Transfection de cellules en réseau tridimensionnel

Les lignées cellulaires précédemment décrites sont mises en suspension dans le milieu de culture. Le lit est disposé au fond d'une boîte de culture. La suspension sert à
 20 ensemencer un lit de microbilles ($1.5-2 \cdot 10^5$ cellules/0,05 gr de billes) vectrices de plasmides portant le gène la galactosidase. Le lit est disposé au fond d'une boîte de culture. Les cellules sont cultivées 10 à 15 jours. On obtient la formation d'une couche cellulaire tridimensionnelle pontant et agglomérant les billes. Cette couche contient également une matrice collagénique abondante.

A la date d'observation les cellules forment un réseau tridimensionnel pontant les différentes particules et les assemblant. La microscopie optique révèle que les cellules contenues dans l'amas de particules sont marquées par la galactosidase.

5

3.2.3 Transfection de cellules dans des cultures de tissu

Matériau utilisé pour le marquage: Type A: poudre sphérique de surface spécifique 0,62 m²/g. Elles ont été calcinées à 1180°C et leur granulométrie est 80-125 µm. La quantité de poudre est de quelques dizaines de particules par boîtes (P15).

10

Quelques billes ont été placées au contact des fragments osseux après avoir été incubées sans pré-immersion (méthode A).

15

Les fragments osseux proviennent de fémurs, tibias et calvaria de rats nouveaux-nés âgés de 3 jours. Les pièces osseuses ont été nettoyées des tissus mous attenants. Les os longs ont été coupés en trois morceaux: 2 épiphyses et la diaphyse. Les calvarias ont été coupées en petits fragments de 2 à 3 mm de côté. Ces différents fragments ont été déposés à la surface d'un gel à 3% d'agar dans du DMEM. Le milieu de culture (DMEM+SVF) a été ensuite rajouté de façon à ce que les fragments affleurent à

20

l'interface liquide-air.

25

Les billes ont été maintenues en contact des tissus pendant 2 à 30 jours, date à laquelle l'activité galactosidase des cellules est mise en évidence avant de faire des coupes histologiques.

A 2 jours de mise en contact, des zones de marquage sporadiques sont identifiables. Le marquage se fait à distance et au contact des billes d'HA. Il a lieu également au contact de ces mêmes billes.

A 30 jours, la totalité des fragments osseux a viré au bleu macroscopiquement (**figure 1**).

La figure 1 représente une macrophotographie d'une culture de tissu osseux en présence de poudre transfectante pendant 30 jours. Le fragment osseux est entièrement
5 bleu en raison de la transfection des cellules par le plasmide vecteur de la galactosidase. En microscopie optique par réflexion, il n'est pas possible de voir une zone qui ne soit pas marquée. Les billes sont engluées dans une matrice marquée par la réaction à la galactosidase.

- 10 Les coupes des différents échantillons de tissu osseux cultivés 30j montrent que les cellules osseuses (ostéoblastes, chondroblastes, cellules péricondrales, cellules périostées, ostéoclastes) sont marquées (la **figure 2** est une coupe histologique du même tissu montrant que toutes les cellules ont été transfectées par la galactosidase X 30).
- 15 Les cellules des lignées hématopoïétiques ne sont pas marquées. Il faut noter que:
- Toutes les cellules osseuses sont marquées
 - Elles le sont quelle que soit la distance des cellules aux billes.

3.2.4 Transfection in vivo

- 20 Un groupe de 10 lapins males NZW âgés de 4 semaines est sélectionné de manière aléatoire. Ces lapins sont divisés en deux groupes : Lot A et Lot B. Un lapin de chaque groupe sert de témoin.

La zone opératoire se situe sur la mandibule côté gauche en arrière des incisives mandibulaires. Il est à noter qu'une étude préliminaire a permis de sélectionner ce site
25 dans lequel l'os est le plus abondant. Le type de poudre P15 a été utilisé. L'ADN a été fixé par la méthode A.

Après la pose de champs stériles et la désinfection cutanée et muqueuse une incision vestibulaire intrabuccale est réalisée à l'aide d'un bistouri. Un lambeau de pleine

épaisseur est récliné pour accéder à la zone osseuse mandibulaire à la base des incisives. Un trépan de 3mm est utilisé pour systématiser l'effraction osseuse. Le défaut osseux réalisé est de l'ordre de 2 mm de profondeur. Le volet osseux est éliminé à l'aide de ciseau à os. Le biomatériau est aspiré à l'aide d'une seringue de 5 ml et
5 déposé dans le défaut osseux de telle manière qu'il le remplisse. Une légère pression est utilisée avec une gaze stérile pour maintenir en place le biomatériau. Le lambeau repositionné est ensuite suturé

Deux témoins subissent une deuxième opération controlatérale sans dépose de biomatériau.

10 Les lapins ont été sacrifiés à 3 et 6 semaines. Les mandibules ont été prélevées, fixées dans l'éthanol et incluse dans de l'hydroxy-éthylmethacrylate. Des coupes de 5 μ m d'épaisseur ont été réalisées et l'activité galactosidase mise en évidence

- A 3 semaines :

15 *Dans les sites témoins:*

Les coupes histologiques montrent un os spongieux avec peu de trabécules dont les pores sont occupés par un tissu stromal très lâche. Il existe des cellules multinucléées d'allure ostéoclastique à la surface des trabécules. Ces cellules sont toutes marquées par la réaction à la galactosidase. De la même manière, tous les monocytes sont également
20 marqués. Ce sont les seules cellules qui sont marquées.

Dans les sites implantés :

Les coupes passant à travers les billes de phosphate de calcium montrent que les billes sont incluses dans un tissu conjonctif relativement dense avec de nombreuses cellules multinucléées à leur surface. Toutes les cellules, fibroblastiques ou multinucléées sont
25 marquées par la galactosidase.

Lorsque les coupes s'éloignent des billes, il existe moins de cellules marquées néanmoins les structures tissulaires n'ayant pas été perturbées par l'acte opératoire donnent des informations intéressantes. Les fibroblastes des ligaments dentaires sont marquées. Il existe des îlots de cellules d'aspect fibroblastique marqués dans le tissu

stromal des pores entre les trabécules. Dans certains cas, il semble même que des cellules de la lignée ostéoblastique soient également marquées.

- 6 semaines :

- 5 Macroscopiquement, il existe un marquage autour des grains d'HA. Les coupes montrent des cellules stromales positives, les cellules des ligaments dentaires ainsi que les odontoblastes expriment le gène.

REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé pour fixer de l'ADN sous forme plasmidique à la surface de poudre ou
céramique de phosphates de calcium caractérisé en ce qu'il comprend une étape a)
consistant en une hydratation de la poudre de phosphate de calcium ou de la céramique
de phosphate de calcium dans une solution de tampon phosphate non saturée en
calcium et phosphate et une étape b) consistant en une immersion des produits obtenus
10 à l'étape a) dans une solution de tampon phosphate non saturée en calcium et phosphate
contenant un ADN simple ou double brin pour des durées variables de quelques
minutes à plusieurs heures, c) obtention de particules de phosphates de calcium
comportant des molécules d'ADN fixées à sa surface.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution de l'étape a) et b)
comprend un tampon phosphate à 0,12 M (pH 6,8).
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'immersion est effectuée
pendant au moins 1, 5, 10 ou 30 minutes jusqu'à environ 12, 24, ou 48 heures à une
20 température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C.
4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les particules de phosphates
de calcium sont maintenues immergées dans un milieu de culture du type des milieux
de culture cellulaire.
- 25 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que les particules de phosphates
de calcium sont immergées pendant environ quelques minutes à quelques jours.

6. Procédé selon l'une des revendications 4 et 5, caractérisé en ce que les particules de phosphates de calcium sont immergées à une température allant de 15 à 50°C, de préférence environ 37°C.
- 5 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée au moyen d'un milieu simulant les fluides extracellulaires ou un milieu du type des milieux de culture cellulaires contenant les acides nucléiques, ledit milieu étant non dénaturant pour l'ADN et non saturé en calcium et phosphate; entraînant une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à la surface desdites poudres et céramiques.
- 10 8. Procédé selon l'une des revendications 1 et 7, caractérisé en ce que les étapes a) et b) sont effectuées simultanément ou successivement.
- 15 9. Utilisation du procédé selon l'une des revendications 7 et 8 pour de fixer l'ADN dans des conditions de pH physiologique sur des particules de phosphate de calcium.
- 20 10. Procédé pour transfecter des cellules isolées, cultivées en monocouche ou en trois dimensions consistant en la mise en contact des cellules à transfecter avec les particules obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8 pendant des durées de quelques heures à quelques semaines.
- 25 11. Procédé pour transfecter des cellules contenues dans un fragment tissulaire cultivé consistant en la mise en contact des cellules à transfecter avec les particules obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8 pendant des durées de quelques heures à quelques semaines.
12. Utilisation des particules obtenues par le procédé selon l'une des revendications 1 à 8 pour la préparation d'un médicament pour transfecter in vivo des cellules contenues dans un tissu ou dans un organe.

13. Poudres et céramiques de phosphates de calcium susceptibles d'être obtenues à partir du procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisées en ce qu'elles supportent une croissance épitaxiale d'apatite carbonatée à leur surface dans des conditions non dénaturantes.

14. Poudres et céramiques de phosphates de calcium selon la revendication 13 comprenant en outre les acides nucléiques fixés à leur surface.

15. Poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 13 et 14 caractérisées en ce qu'elles possèdent au moins l'une des propriétés suivantes :

- Nature des groupes chargés à la surface : PO_4^- , OH^- , Ca^{++}
- pH de surface basique
- Potentiel électrocinétique négatif

- Hydrophobe

- granulométrie comprise entre 0-200 μm , en particulier entre 80-125 μm et 0-25 μm .

16. Poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 13 à 15 caractérisées en ce qu'elles comprennent en outre un noyau composé d'un autre matériau polymérique, céramique ou métallique, de préférence magnétique.

17. Particules formées à base de poudres de phosphates de calcium selon l'une des revendications 13 à 16 comprises dans une matrice minérale ou polymérique en particulier dans des ciments de phosphate ou de sulfate de calcium.

18. Utilisation des poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 13 à 16 pour la transfection de cellules *in vitro*

19. Utilisation des poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 13 à 16 pour la fabrication d'un médicament pour la transfection de cellules *in vivo*.
- 5 20. Utilisation des poudres et céramiques de phosphates de calcium selon l'une des revendications 13 à 16 pour la culture de cellules transfectées en trois dimensions avec formation d'une matrice cellulaire et extracellulaire agrégeant les particules.



BEST AVAILABLE COPY

FIGURE 1

10/540854

2 / 2

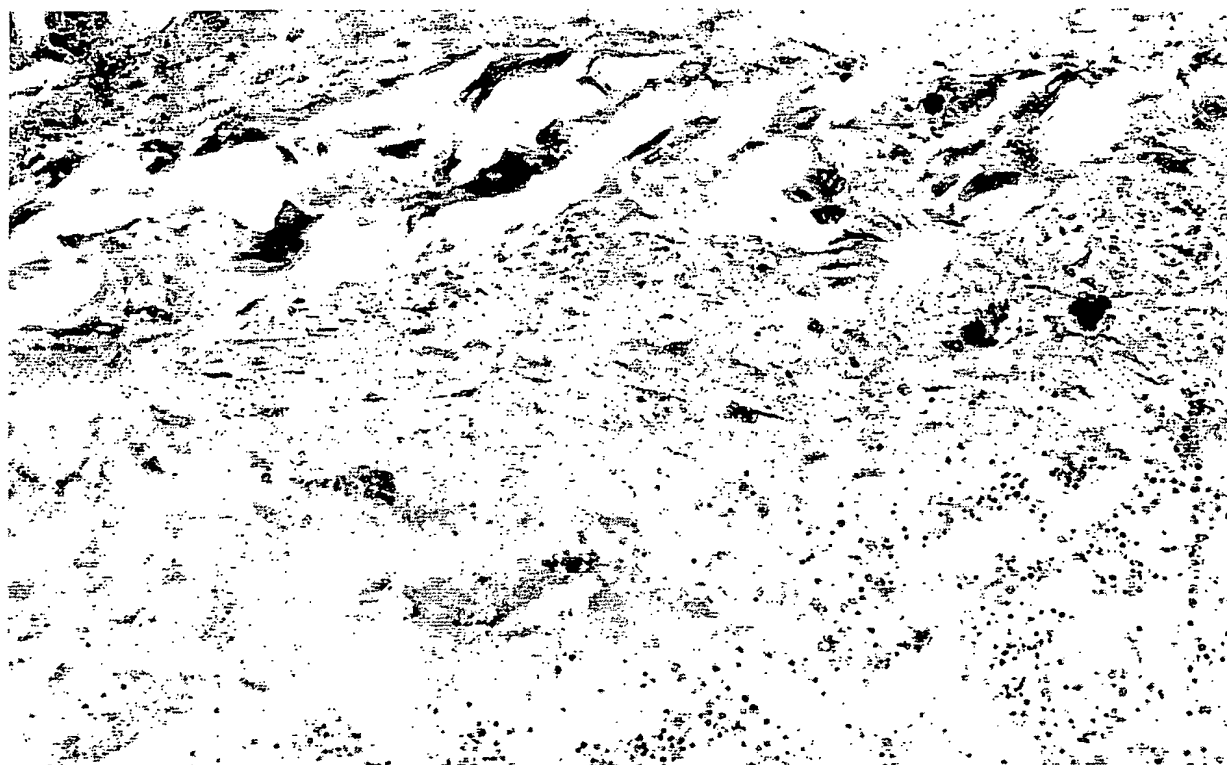


FIGURE 2

BEST AVAILABLE COPY